

МАТЕРИАЛЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ “ПРОБЛЕМЫ
ХИМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ И РЕПАРАЦИИ ПРИ РАДИАЦИОННЫХ
ВОЗДЕЙСТВИЯХ” (Дубна, 30–31 мая 2018 г.)

УДК: 57.084.1:615.28:539.1.047:616-006.6

ИНГИБИРОВАНИЕ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК
В КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА
С ПОМОЩЬЮ НИКЛОЗАМИДА

© 2019 г. А. С. Жирник*, Ю. П. Сёмочкина, Е. Ю. Москалёва

НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

* E-mail: as.zhirnik@mail.ru

Поступила в редакцию 25.06.2018 г.

В работе исследовано радиосенсибилизирующее действие никлозамида в отношении клеток аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR и молекулярные механизмы, лежащие в его основе. Оценивали выживаемость опухолевых клеток при действии никлозамида, γ -излучения и их комбинации. Уровень MDR1, Bcl-2, β -катенина и гистона γ H2AX — маркера двунитевых разрывов (ДР) ДНК — определяли при использовании иммуноцитохимических методов с помощью проточной цитофлуориметрии. Показано, что совместное действие никлозамида и γ -излучения приводило к более интенсивной гибели опухолевых клеток, чем при действии никлозамида и γ -излучения по отдельности. Обнаружено снижение уровня β -катенина в клетках линии COLO 320 HSR при действии никлозамида, которое было более интенсивным при совместном действии никлозамида и облучения. В то же время содержание β -катенина в клетках линии SW837 оставалось неизменным при действии никлозамида, γ -излучения и их комбинированном применении. Никлозамид не приводил к образованию ДР ДНК в необлученных клетках и не увеличивал их уровень через 1 ч после радиационного воздействия. Обработка клеток перед облучением никлозамидом приводила к тому, что уровень гистона γ H2AX, отражающий количество ДР ДНК, через 24 ч после облучения в 1.6 раза превышал таковой в интактных клетках и клетках, подвергшихся воздействию только радиации. Это свидетельствует об ингибировании репарации индуцированных γ -излучением ДР ДНК. Таким образом, никлозамид обладает радиосенсибилизирующим действием в отношении клеток колоректального рака человека, в основе которого лежит ингибирование репарации ДР ДНК. Ингибирование сигнального пути Wnt/ β -катенин при действии никлозамида обнаруживается не во всех типах опухолевых клеток.

Ключевые слова: никлозамид, двунитевые разрывы ДНК, репарация ДНК, γ H2AX, β -катенин, радиосенсибилизаторы, ионизирующее излучение, аденокарцинома прямой кишки, карцинома сигмовидной кишки

DOI: 10.1134/S0869803119020218

Лучевая терапия является одним из основных методов лечения колоректального рака (КРР) [1]. Эффективность лучевой терапии может быть недостаточной при высокой радиоустойчивости опухолевых клеток. Поэтому актуальной проблемой является поиск новых малотоксичных радиосенсибилизаторов, способных повышать чувствительность опухолевых клеток к действию ионизирующего излучения [2, 3].

Результаты многочисленных исследований последних лет указывают на то, что антигельминтный препарат никлозамид (5-хлор-N-(2-хлор-4-нитрофенил)-2-гидроксibenзамид) обладает цитотоксической активностью в отношении различных типов опухолевых клеток, в основе которой, как показано ранее, лежит нарушение функциональной активности митохондрий и ин-

гибирование ряда сигнальных путей, включая Wnt/ β -катенин, STAT3, Notch, NF- κ B и mTOR [4, 5]. Кроме того, обнаружена способность никлозамида повышать чувствительность опухолевых клеток к облучению [6–8]. Lee и соавт. показали, что совместное использование никлозамида и γ -излучения приводит к повышению уровня фосфорилированных белков p38 MAPK и c-Jun в клетках линии H1299 и увеличению количества клеток в состоянии апоптоза до более высоких значений, чем в случае воздействия каждого из этих факторов по отдельности [6]. Также обнаружено, что никлозамид блокирует вызванную облучением активацию сигнальных путей STAT3/Bcl-2/Bcl-XL и mTOR и повышает чувствительность клеток рака легкого с приобретенной радиоустойчивостью к действию радиации *in*

vitro и *in vivo* [7]. Радиосенсибилизирующая активность никлозамида в отношении клеток рака легкого может быть обусловлена также ингибированием молекулярного каскада HIF-1 α /VEGF [8].

Целью данной работы было исследование радиосенсибилизирующей активности никлозамида в отношении клеток аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR, и молекулярных механизмов, лежащих в ее основе. В частности, было исследовано влияние никлозамида, облучения и их совместного действия на уровень β -катенина, отражающего активность сигнальной системы Wnt, и на уровень гистона γ H2AX, отражающего количество двуниевых разрывов (ДР) ДНК. Уровень ДР ДНК исследовали через 1 ч – время накопления максимального количества ДР ДНК – и через 24 ч после облучения – время завершения репарации ДР ДНК и возвращения содержания гистона γ H2AX к исходному уровню – уровню контроля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Реактивы. Никлозамид, 0.4%-ный раствор трипанового синего, диметилсульфоксид (ДМСО) и бычий сывороточный альбумин приобретены в компании “Sigma-Aldrich” (США). Параформальдегид приобретен в компании “Panreac” (Испания). Никлозамид растворяли в ДМСО и хранили в виде стока с концентрацией 10 ммоль/л при -20°C . Для достижения нужной концентрации готовили разведения стока никлозамида в культуральной среде; содержание ДМСО при добавлении никлозамида к клеткам не превышало 0.1% и не оказывало токсического действия на клетки.

Культивирование клеток. Клетки аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR приобретены в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (“Gibco”, США), содержащей 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота (СПК; “HyClone”, США) и 50 мкг/мл гентамицина (“ICN”, США), в пластиковых культуральных флаконах (“Corning-Costar”, США) в CO_2 -инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2 .

Анализ выживаемости клеток. Клетки высевали в 12-луночные культуральные планшеты по 40 тыс. клеток/луноку за сутки до исследования, инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкмоль/л в течение 24 ч и подвергали воздействию γ -излучения (^{60}Co , 0.75 Гр/мин, установка “ГУТ-200М”) в дозе 2 Гр при комнатной температуре. Через 1 ч после облучения заменяли среду на

среду без никлозамида и продолжали культивирование клеток в течение 7 сут. Выживаемость определяли по количеству живых клеток в контрольных и опытных пробах с помощью камеры Горяева после окрашивания трипановым синим.

Анализ содержания белков MDR1 и Vcl-2. Для анализа уровня MDR1 клетки трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ, pH 7.4), суспендировали в 100 мкл ФСБ, содержащего 3% СПК, в концентрации 2×10^6 клеток/мл и инкубировали с моноклональными антителами мыши к CD243 (MDR1), меченными фикоэритрином (1:20, “BioLegend”, США), в течение 60 мин при 4°C в темноте. Затем клетки отмывали в ФСБ, содержащем 3% СПК. Для измерения здесь и далее использовали не менее 20 тыс. клеток. Для получения отрицательного контроля использовали изотипические моноклональные антитела мыши, меченные фикоэритрином (1:20, “BioLegend”, США). Долю окрашенных клеток и среднюю интенсивность их флуоресценции анализировали при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 585 нм на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (“BD Biosciences”, США).

Для анализа уровня Vcl-2 клетки промывали ФСБ, фиксировали в 2%-ном растворе параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. Образцы хранили в ФСБ, содержащем 0.02% NaN_3 , при 4°C до проведения измерений. Перед исследованием клетки пермеабилizировали с помощью ФСБ, содержащего 0.25% тритона X-100 и 2% бычьего сывороточного альбумина, в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем отмывали в ФСБ, содержащем 0.1% тритона X-100 и 10% СПК, и инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши к Vcl-2 (1:20, “Sigma-Aldrich”, США) в течение 60 мин при комнатной температуре. Потом отмывали и инкубировали со вторичными поликлональными антителами козы к иммуноглобулинам мыши, меченными Alexa Fluor 488 (1:200, “BioLegend”, США), в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем отмывали в ФСБ, содержащем 0.1% тритона X-100 и 10% СПК. Для получения отрицательного контроля использовали вторичные антитела. Долю окрашенных клеток и среднюю интенсивность их флуоресценции анализировали, как описано выше, но при длине волны возбуждения 488 нм и полосе пропускания 530 нм.

Анализ содержания β -катенина. Клетки высевали в 6 см чашки Петри в количестве 2×10^6 клеток/чашку за сутки до исследования, инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкмоль/л в течение 4 ч, подвергали воздействию γ -излучения в дозе 2 Гр и инкубировали в среде, содержащей никлозамид, в течение 24 ч. Через 24 ч после облучения эти клетки, а также контрольные клет-

ки и клетки, обработанные никлозамидом в концентрации 2 мкмоль/л, снимали с подложки, промывали ФСБ, фиксировали в 2%-ном растворе параформальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. Образцы хранили в ФСБ, содержащем 0.02% NaN_3 , при 4°C до проведения измерений. Перед исследованием клетки пермеабилizировали с помощью ФСБ, содержащего 0.25% тритона X-100 и 3% СПК, в течение 30 мин при комнатной температуре. Отмывали и инкубировали с моноклональными антителами мыши к β -катенину, меченными Alexa Fluor 488 (1:100, "eBioscience", США), в ФСБ, содержащем 3% СПК, в течение 60 мин при комнатной температуре, а затем отмывали в ФСБ, содержащем 3% СПК. Для получения отрицательного контроля использовали изотипические моноклональные антитела мыши, меченные Alexa Fluor 488 (1:100, "BD Pharmingen", США). Долю окрашенных клеток и среднюю интенсивность их флуоресценции анализировали, как описано выше.

Анализ содержания гистона γH2AX . Клетки линий SW837 и COLO 320 HSR за сутки до исследования высевали в 3.5 см чашки Петри в количестве 700 и 500 тыс. клеток/чашку соответственно, инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкмоль/л в течение 4 ч, подвергали воздействию γ -излучения в дозе 2 Гр и культивировали в присутствии никлозамида в течение 1 ч или 24 ч. Через 1 ч и 24 ч после облучения эти клетки, а также контрольные клетки и клетки, обработанные никлозамидом в концентрации 2 мкмоль/л, снимали с подложки, промывали ФСБ и фиксировали в абсолютном метаноле при 4°C в течение 20 мин. Образцы хранили в абсолютном метаноле при -20°C до проведения измерений. Перед исследованием клетки отмывали от метанола, инкубировали с моноклональными антителами мыши к гистону γH2AX , меченными Alexa Fluor 488 (1:100, "BD Pharmingen", США), в ФСБ, содержащем 3% СПК, в течение 60 мин при комнатной температуре, отмывали в ФСБ, содержащем 3% СПК. Для получения отрицательного контроля использовали изотипические моноклональные антитела мыши, меченные Alexa Fluor 488 (1:100, "BD Pharmingen", США). Долю окрашенных клеток и среднюю интенсивность их флуоресценции анализировали, как описано выше.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы OriginPro ("OriginLab", США) с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Данные представляли в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

В работе использован проточный цитофлуориметр BD FACSCalibur ресурсного центра молекулярной и клеточной биологии.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ экспрессии белков MDR1 и Bcl-2 в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR

Уровень экспрессии MDR1 (ABC-транспортер ABCB1) и Bcl-2 в клетках KPP человека определяли после инкубации с соответствующими антителами с помощью проточной цитофлуориметрии. Обнаружен более высокий уровень экспрессии белка MDR1 в клетках карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR, чем в клетках аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 (рис. 1, А, Б). В то же время содержание белка Bcl-2 в клетках обеих линий было близким (рис. 1, В, Г).

Влияние никлозамида на радиочувствительность клеток линий SW837 и COLO 320 HSR

Для определения радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR исследовали их выживаемость после инкубации с препаратом в течение 24 ч через 7 сут после облучения. Ранее нами было показано, что значение IC_{50} никлозамида как для клеток линии SW837, так и для клеток линии COLO 320 HSR составляет 2 мкмоль/л при их культивировании в присутствии препарата в течение 3 сут [9, 10]. В то же время для адекватной оценки влияния облучения на выживаемость опухолевых клеток, определяемую по клоногенной активности или по количеству живых клеток, необходимо более длительное культивирование, составляющее не менее 7 сут. Увеличение длительности культивирования клеток в присутствии никлозамида в указанной концентрации с 3 до 7 сут приводило к гибели 80–90% клеток. Поэтому для исследования радиосенсибилизирующей активности никлозамида при культивировании клеток KPP в течение 7 сут предварительно были подобраны условия, обеспечивающие относительно низкую цитотоксическую активность этого препарата: клетки инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкмоль/л в течение 24 ч, затем облучали в дозе 2 Гр и через 1 ч после облучения среду с никлозамидом удаляли и добавляли свежую среду. Как следует из рис. 2, выживаемость опухолевых клеток линий SW837 и COLO 320 HSR при действии никлозамида в этих условиях снижалась до $68.7 \pm 1.3\%$ и $76.0 \pm 0.6\%$ от контроля соответственно, что было сравнимо с действием γ -излучения в дозе 2 Гр. Использование никлозамида в комбинации с облучением приводило к более глубокому снижению выживаемости клеток линий SW837 и COLO 320 HSR – до $58.7 \pm 3.2\%$ и $54.6 \pm 0.2\%$ от контроля соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что

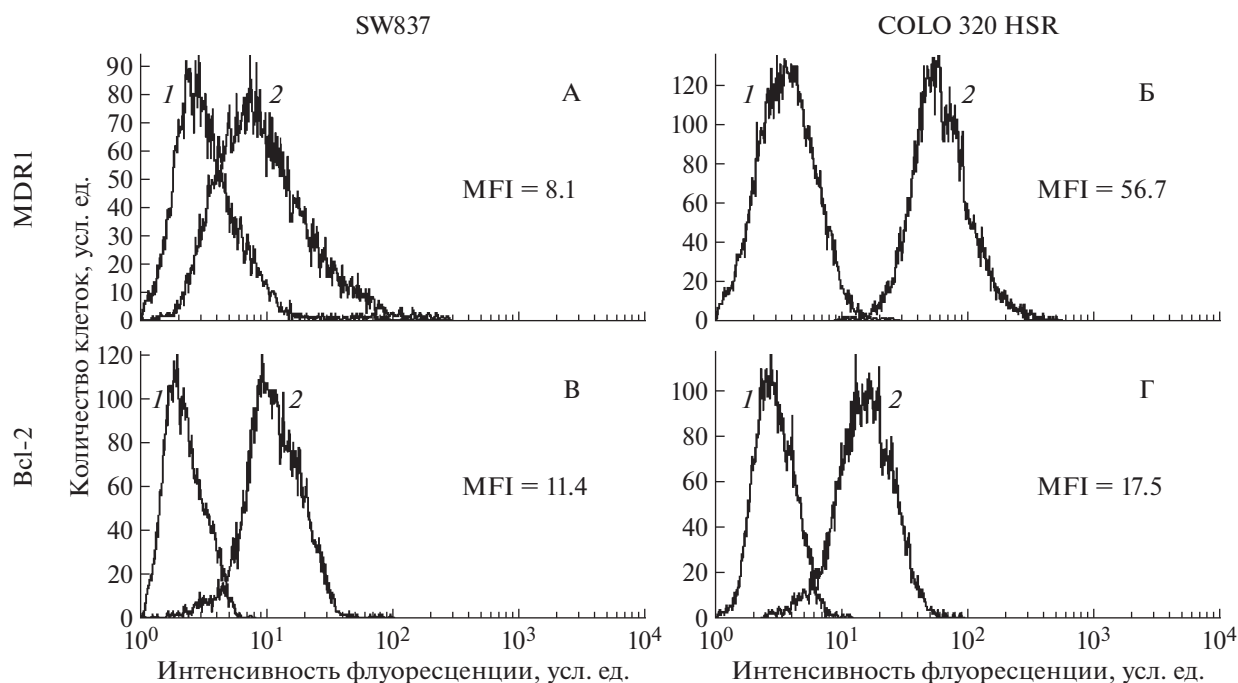


Рис. 1. Экспрессия белков MDR1 (А, Б) и Bcl-2 (В, Г) в клетках КРП человека линий SW837 (А, В) и COLO 320 HSR (Б, Г). 1 – аутофлуоресценция; 2 – флуоресценция клеток, окрашенных соответствующими антителами. MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Данные одного из трех типичных экспериментов.

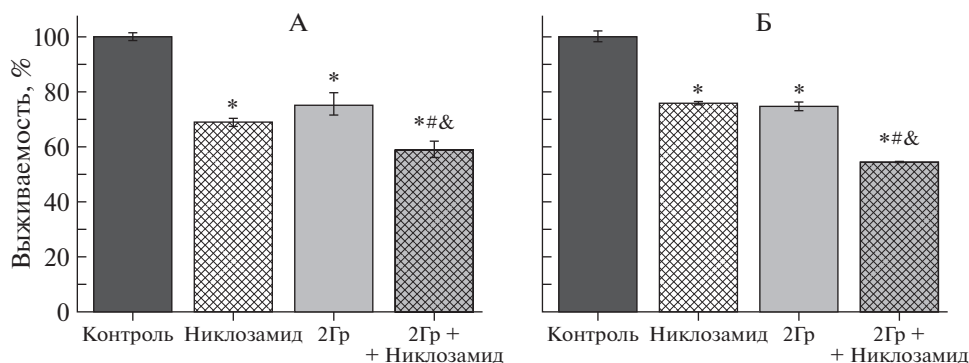


Рис. 2. Влияние никлозамида (2 мкмоль/л), γ -излучения (2 Гр) и их комбинации на выживаемость клеток линий SW837 (А) и COLO 320 HSR (Б) через 7 сут после облучения. Данные представлены в процентах от контроля.

* Отличия от контроля статистически значимы, $p < 0.05$; & – отличия от действия γ -излучения статистически значимы, $p < 0.05$; # – отличия от действия никлозамида статистически значимы, $p < 0.05$.

никлозамид повышает эффективность действия γ -излучения на клетки исследованных линий *in vitro*.

Влияние никлозамида и γ -излучения на активность сигнального пути Wnt/ β -катенин в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR

С помощью проточной цитофлуориметрии было обнаружено, что клетки аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR экспрессируют β -катенин, что свидетельствует об активном состоянии каноническо-

го сигнального пути Wnt в данных клетках (рис. 3, А, Б). Уровень β -катенина в клетках линии SW837 оставался практически неизменным, как при действии никлозамида в концентрации 2 мкмоль/л, так и γ -излучения в дозе 2 Гр (рис. 3, В). В облученных клетках данной линии, культивируемых в среде с добавлением никлозамида, количество β -катенина также было сравнимо с контролем (рис. 3, А, В). Уровень β -катенина в клетках линии COLO 320 HSR снижался при действии никлозамида в концентрации 2 мкмоль/л и γ -излучения в дозе 2 Гр до $67.9 \pm 2.3\%$ и $86.1 \pm 4.5\%$ от

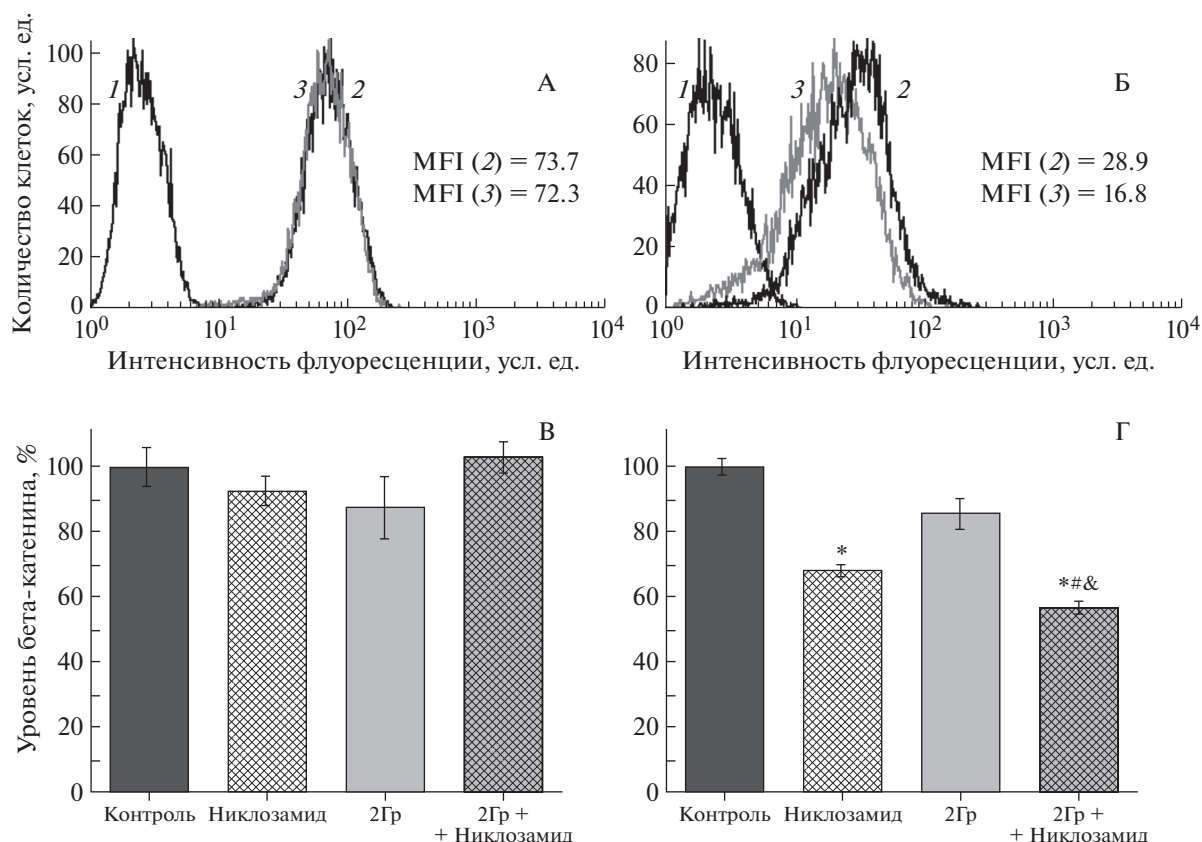


Рис. 3. Уровень β -катенина в клетках линий SW837 (А, В) и COLO 320 HSR (Б, Г) после действия никлозамида (2 мкмоль/л), γ -излучения (2 Гр) и их комбинации. Окрашивание антителами к β -катенину. 1 – аутофлуоресценция; 2 – флуоресценция контрольных клеток; 3 – флуоресценция клеток при совместном действии никлозамида и γ -излучения. MFI – средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед.

* Отличия от контроля статистически значимы, $p < 0.05$; & – отличия от действия никлозамида статистически значимы, $p < 0.05$; # – отличия от действия γ -излучения статистически значимы, $p < 0.05$.

контроля соответственно (рис. 3, Г). Совместное действие никлозамида и γ -излучения на клетки линии COLO 320 HSR приводило к статистически значимому снижению уровня β -катенина (рис. 3, Б), более глубокому, чем при действии никлозамида и γ -излучения по отдельности (рис. 3, Г).

Определение уровня ДР ДНК в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR при действии никлозамида и γ -излучения

Об уровне накопления и репарации ДР ДНК в опухолевых клетках судили по содержанию гистона γ H2AX через 1 ч и 24 ч после облучения (рис. 4). Действие γ -излучения в дозе 2 Гр приводило к увеличению уровня гистона γ H2AX в 2.0 и 1.8 раз относительно фонового уровня в клетках аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR соответственно через 1 ч после облучения. Через 24 ч уровень гистона γ H2AX в облученных клетках снижался до исход-

ного значения. При культивировании клеток линий SW837 и COLO 320 HSR в присутствии никлозамида в концентрации 2 мкмоль/л не наблюдали изменения уровня гистона γ H2AX в соответствующие интервалы времени. В то же время при совместном действии никлозамида и γ -излучения полного восстановления количества ДР ДНК в опухолевых клетках обеих линий не происходило, и их количество в 1.6 раз превышало фоновый уровень.

ОБСУЖДЕНИЕ

Перспективным способом повышения эффективности лучевой терапии, широко применяемой при лечении рака прямой кишки, представляется использование радиосенсибилизаторов, повышающих чувствительность опухолевых клеток к действию излучения.

Согласно данным литературы, никлозамид проявляет радиосенсибилизирующую активность в отношении опухолевых клеток после проникновения через плазматическую мембрану и

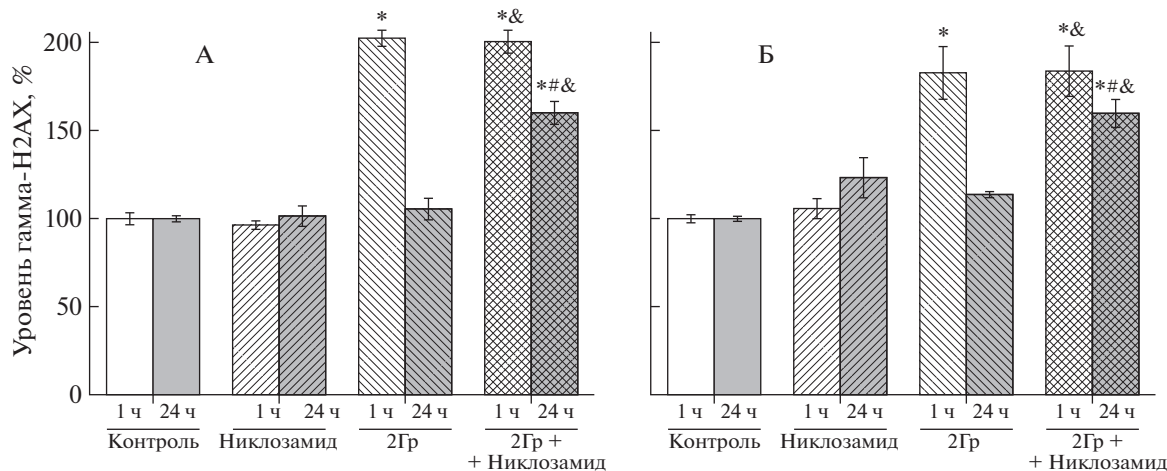


Рис. 4. Уровень гистона γ H2AX в клетках линий SW837 (А) и COLO 320 HSR (Б) после действия никлозамида (2 мкмоль/л), γ -излучения (2 Гр) и их комбинации через 1 ч и 24 ч после облучения. Окрашивание антителами к гистону γ H2AX. Значение MF1 в контроле составило 8.2 и 5.0 усл. ед. для клеток линий SW837 и COLO 320 HSR соответственно. Данные представлены в процентах от контроля.

* Отличия от контроля значимы, $p < 0.05$; & – отличия от действия никлозамида статистически значимы, $p < 0.05$; # – отличия от действия γ -излучения через 24 ч статистически значимы, $p < 0.05$.

взаимодействия с внутриклеточными мишенями. Ввиду высокой гидрофобности [11], никлозамид может быть субстратом ABC-транспортёров, и, в первую очередь, белка ABCB1 (MDR1), и не исключено, что в конечном итоге это приведет к снижению эффективности его радиосенсибилизирующего действия. В то же время показано, что высокий уровень экспрессии белка Bcl-2 препятствует гибели опухолевых клеток под действием излучения благодаря ингибированию развития апоптоза [12]. При исследовании уровня экспрессии белков MDR1 и Bcl-2 в клетках KPP линий SW837 и COLO 320 HSR обнаружено (рис. 1), что клетки обеих линий экспрессируют белки MDR1 и Bcl-2, а следовательно могут быть устойчивы к действию излучения и ряда противоопухолевых препаратов.

При исследовании радиосенсибилизирующей активности никлозамида в отношении клеток аденокарциномы прямой кишки человека линии SW837 и карциномы сигмовидной кишки человека линии COLO 320 HSR в выбранных условиях никлозамид приводил к снижению выживаемости клеток линий SW837 и COLO 320 HSR до $68.7 \pm 1.3\%$ и $76.0 \pm 0.6\%$ от контроля соответственно (рис. 2). Опухолевые клетки подвергали воздействию γ -излучения в дозе 2 Гр, соответствующей разовой дозе, используемой при фракционированном облучении опухолей. Выживаемость клеток обеих исследованных линий через 7 сут после облучения составила около 70% от контроля. Показано, что при совместном действии никлозамида и облучения выживаемость клеток линий SW837 и COLO 320 HSR снижалась до 58.7 ± 3.2 и $54.6 \pm 0.2\%$ от контроля соответ-

ственно. Полученные результаты свидетельствуют о высокой радиосенсибилизирующей активности никлозамида (рис. 2).

Известно, что в клетках KPP вследствие мутаций в генах, кодирующих белки “дестабилизирующего комплекса” (APC, Axin) и β -катенин, происходит активация канонического сигнального пути Wnt [13]. Ингибирование указанного молекулярного каскада под действием никлозамида может обуславливать, по крайней мере отчасти, его цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток [14]. Снижение активности сигнального пути Wnt/ β -катенин рассматривается также в качестве возможного механизма радиосенсибилизирующего действия никлозамида в отношении клеток трижды негативного рака молочной железы [15]. Исходя из этого, повышение чувствительности клеток KPP исследуемых линий к действию излучения с помощью никлозамида могло бы быть следствием ингибирования сигнального пути Wnt/ β -катенин. Для исследования влияния никлозамида на систему Wnt/ β -катенин клетки инкубировали с препаратом в концентрации 2 мкмоль/л в течение 28 ч. При изучении совместного действия никлозамида и облучения на данный сигнальный путь клетки инкубировали с никлозамидом в течение 4 ч, подвергали воздействию γ -излучения и далее культивировали облученные клетки в среде с никлозамидом в концентрации 2 мкмоль/л еще в течение 24 ч. Содержание β -катенина в клетках линии SW837 оставалось неизменным при действии никлозамида в концентрации 2 мкмоль/л, облучения в дозе 2 Гр и их комбинации (рис. 3, А, В). Напротив, уровень β -катенина в клетках линии COLO

320 HSR снижался до 67.9 ± 2.3 и $86.1 \pm 4.5\%$ от контроля при действии никлозамида в концентрации 2 мкмоль/л и γ -излучения в дозе 2 Гр соответственно. При комбинированном применении никлозамида и γ -излучения в клетках данной линии наблюдали более глубокое снижение уровня β -катенина (рис. 3, Б) в сравнении с действием никлозамида и γ -излучения по отдельности (рис. 3, Г). Полученные данные свидетельствуют об ингибировании системы Wnt под действием никлозамида в клетках линии COLO 320 HSR. Однако совокупность данных, полученных в отношении действия никлозамида на клетки линии SW837 в сравнении с его действием на клетки линии COLO 320 HSR, свидетельствует о наличии и иных механизмов, обуславливающих цитотоксическую и радиосенсибилизирующую активность никлозамида в отношении клеток КРР.

Действие γ -излучения на клетки сопровождается индукцией повреждений ДНК. Репарация ДР ДНК, наиболее тяжелого типа повреждений ДНК при действии γ -излучения, сопровождается каскадом реакций фосфорилирования, что требует значительного расхода энергии АТФ. В ряде исследований было показано, что никлозамид разобщает клеточное дыхание и окислительное фосфорилирование и приводит к снижению уровня АТФ в различных типах опухолевых клеток [16–21], в том числе в клетках КРР [22]. Это позволило предположить, что никлозамид может опосредованно ингибировать репарацию ДР ДНК, снижая уровень АТФ в опухолевых клетках. Способность никлозамида влиять на количество индуцированных излучением ДР ДНК была недавно показана в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 [23] и карциномы носоглотки человека линий CNE-2 и HONE-1 [24]. При изучении влияния никлозамида на процесс репарации ДР ДНК, вызванных облучением, клетки инкубировали с никлозамидом в концентрации 2 мкмоль/л в течение 4 ч, подвергали воздействию γ -излучения в дозе 2 Гр и далее культивировали облученные клетки в среде с никлозамидом еще в течение 1 ч и 24 ч. При исследовании уровня гистона γ H2AX, который рассматривают как суррогатный маркер ДР ДНК, в клетках линий SW837 и COLO 320 HSR было обнаружено увеличение ДР ДНК через 1 ч после действия γ -излучения (рис. 4). Через 24 ч после облучения было обнаружено полное восстановление уровня гистона γ H2AX в клетках обеих исследованных линий КРР, в то время как в клетках, предварительно обработанных никлозамидом, уровень γ H2AX оставался в 1.6 раза выше, чем в контрольных клетках (рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют об интенсивном ингибировании репарации ДР ДНК при облучении опухолевых клеток в присутствии никлозамида. Длительное сохранение индуцированных

γ -излучением ДР ДНК в клетках из-за ингибирования процессов репарации в присутствии никлозамида может приводить к блоку клеточного цикла и гибели опухолевых клеток в более поздние сроки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что никлозамид повышает чувствительность клеток КРР человека к действию γ -излучения, несмотря на высокий уровень экспрессии в них белков MDR1 и Vcl-2, определяющих устойчивость опухолевых клеток к разным повреждающим воздействиям. Ингибирование сигнального пути Wnt/ β -катенин в опухолевых клетках не является единственно возможным механизмом действия никлозамида, так как оно, в отличие от ингибирования репарации ДР ДНК, обнаруживается не во всех типах клеток КРР. Полученные результаты позволяют заключить, что в основе радиосенсибилизирующего действия никлозамида лежит именно ингибирование репарации ДР ДНК, которое может быть опосредовано повреждением митохондрий и снижением уровня АТФ в опухолевых клетках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hafner M.F., Debus J.* Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives // *Visc. Med.* 2016. V. 32. № 3. P. 172–177.
2. *Ding M., Zhang E., He R. et al.* Newly developed strategies for improving sensitivity to radiation by targeting signal pathways in cancer therapy // *Cancer Sci.* 2013. V. 104. № 11. P. 1401–1410.
3. *Kumar S., Singh R.K., Meena R.* Emerging targets for radioprotection and radiosensitization in radiotherapy // *Tumour Biol.* 2016. V. 37. № 9. P. 11589–11609.
4. *Li Y., Li P.K., Roberts M.J. et al.* Multi-targeted therapy of cancer by niclosamide: A new application for an old drug // *Cancer Lett.* 2014. V. 349. № 1. P. 8–14.
5. *Москалева Е.Ю., Перевозчикова В.Г., Жирник А.С. и др.* Молекулярные механизмы противоопухолевой активности никлозамида // *Биомед. химия.* 2015. Т. 6. № 61. С. 680–693.
6. *Lee S.L., Son A.R., Ahn J. et al.* Niclosamide enhances ROS-mediated cell death through c-Jun activation // *Biomed. Pharmacother.* 2014. V. 68. № 5. P. 619–624.
7. *You S., Li R., Park D. et al.* Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer // *Mol. Cancer Ther.* 2014. V. 13. № 3. P. 606–616.
8. *Xiang M., Chen Z., Yang D. et al.* Niclosamide enhances the antitumor effects of radiation by inhibiting the hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor signaling pathway in human lung cancer cells // *Oncol. Lett.* 2017. V. 14. № 2. P. 1933–1938.
9. *Жирник А.С., Семочкина Ю.П., Москалева Е.Ю. и др.* Молекулярные механизмы противоопухолевой активности полимерной формы никлозамида в от-

- ношении клеток колоректального рака // Биомед. химия. 2017. Т. 63. № 2. С. 132–138.
10. *Жирник А.С., Семочкина Ю.П., Москалева Е.Ю. и др.* Антипролиферативная активность никлозамида в отношении клеток меланомы и колоректального рака // Хим.-фарм. журн. 2016. Т. 50. № 7. С. 40–43.
 11. World Health Organization. Specifications and evaluations for public health pesticides: Niclosamide. Geneva: WHO Press, 2002.
 12. *Mirkovic N., Voehringer D.W., Story M.D. et al.* Resistance to radiation-induced apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols // Oncogene. 1997. V. 15. № 12. P. 1461–1470.
 13. *Zhan T., Rindtorff N., Boutros M.* Wnt signaling in cancer // Oncogene. 2017. V. 36. № 11. P. 1461–1473.
 14. *Osada T., Chen M., Yang X.Y. et al.* Anthelmintic compound niclosamide downregulates Wnt signaling and elicits antitumor responses in tumors with activating APC mutations // Cancer Res. 2011. V. 71. № 12. P. 4172–4182.
 15. *Yin L., Gao Y., Zhang X. et al.* Niclosamide sensitizes triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation in association with the inhibition of Wnt/beta-catenin signaling // Oncotarget. 2016. V. 7. № 27. P. 42126–42138.
 16. *Curnock A.P., Thomson T.A., Westwood R. et al.* Inhibition of stimulated Jurkat cell adenosine 3',5'-cyclic monophosphate synthesis by the immunomodulatory compound HR325 // Biochem. Pharmacol. 2001. V. 61. № 2. P. 227–235.
 17. *Park S.J., Shin J.H., Kang H. et al.* Niclosamide induces mitochondria fragmentation and promotes both apoptotic and autophagic cell death // BMB Rep. 2011. V. 44. № 8. P. 517–522.
 18. *Tao H., Zhang Y., Zeng X. et al.* Niclosamide ethanolamine-induced mild mitochondrial uncoupling improves diabetic symptoms in mice // Nat. Med. 2014. V. 20. № 11. P. 1263–1269.
 19. *Zhao J., He Q., Gong Z. et al.* Niclosamide suppresses renal cell carcinoma by inhibiting Wnt/beta-catenin and inducing mitochondrial dysfunctions // Springerplus. 2016. V. 5. № 1. P. 1436.
 20. *Chen L., Wang L., Shen H. et al.* Anthelmintic drug niclosamide sensitizes the responsiveness of cervical cancer cells to paclitaxel via oxidative stress-mediated mTOR inhibition // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. V. 484. № 2. P. 416–421.
 21. *Zhou J., Jin B., Jin Y. et al.* The anthelmintic drug niclosamide effectively inhibits the malignant phenotypes of uveal melanoma in vitro and in vivo // Theranostics. 2017. V. 7. № 6. P. 1447–1462.
 22. *Mook R.A.Jr., Ren X.R., Wang J. et al.* Benzimidazole inhibitors from the Niclosamide chemotype inhibit Wnt/beta-catenin signaling with selectivity over effects on ATP homeostasis // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. № 6. P. 1804–1816.
 23. *Шуватова В.Г., Кувырченкова А.П., Семочкина Ю.П. и др.* Радиосенсибилизация опухолевых стволовых клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 в помощью никлозамида // Мед. радиология и радиац. безопасность. 2017. Т. 62. № 6. С. 5–11.
 24. *Li J., Li H., Zhan D. et al.* Niclosamide sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation by downregulating Ku70/80 expression // J. Cancer. 2018. V. 9. № 4. P. 736–744.

Inhibition of DNA Double Strand Break Repair by Niclosamide in Human Colorectal Cancer Cells

A. S. Zhirnik[#], Y. P. Semochkina, and E. Yu. Moskaleva

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

[#] E-mail: as.zhirnik@mail.ru

This study is aimed to investigate the radiosensitizing activity of niclosamide against SW837 human rectal adenocarcinoma and COLO 320 HSR human sigmoid colon carcinoma cells and underlying molecular mechanisms. Cancer cells were exposed to niclosamide, γ -radiation, or combination of both and a cell survival assay was performed. The levels of MDR1, Bcl-2, β -catenin and histone γ H2AX, a marker of DNA double strand breaks (DSB), were assessed by flow cytometry after immunocytochemical staining. Combination of niclosamide and γ -irradiation led to a more significant decrease in cancer cell survival compared to niclosamide and γ -irradiation alone. Niclosamide decreased β -catenin levels in COLO 320 HSR cells, and combination of niclosamide and γ -irradiation had more profound effects on β -catenin expression. In contrast, β -catenin levels remained unchanged in SW837 cells exposed to niclosamide, γ -radiation, or their combination. Niclosamide neither induced DNA DSB in non-irradiated cells nor enhanced the DNA damage 1 h after irradiation. However, a combined treatment by niclosamide and γ -irradiation led to an increase in the γ H2AX level 24 h after exposure, which remained 1.6-fold higher than in the control and irradiated cells, indicating inhibition of the γ -radiation-induced DNA DSB repair. These results suggest that niclosamide may sensitize human colorectal cancer cells to ionizing radiation by inhibiting DNA DSB repair. Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling by niclosamide was not observed in all cancer cell types.

Keywords: niclosamide, DNA double strand breaks, DNA repair, γ H2AX, β -catenin, radiosensitizers, ionizing radiation, rectal adenocarcinoma, sigmoid colon carcinoma